

## **Válasz Dr. Mándi Yvette professzor asszonynak, az MTA doktorának opponensi véleményére**

Nagyon köszönöm Dr. Mándi Yvette professzor asszonynak, hogy elbírálta értekezésemet, és köszönöm a dolgozatról alkotott elismerő véleményét.

Kérdéseire a válaszaim a következők:

**1.** A CD133 (prominin) molekula valóban fontos, akár a sejtek szeparálására is alkalmas membrán molekula az emberi vérképző ős- és korai elődsejtek, valamint több más szöveti őssejt (neuronális őssejtek, számos tumor őssejt, stb.) felszínén. Ezt használják ki például a klinikai gyakorlatban, amikor a csontvelő-transzplantációt nem teljes csontvelővel, hanem – elsősorban a *graft versus host* betegség (GVHD) kockázatának csökkentése érdekében – izolált CD133 pozitív sejtekkel végzik. A mesenchymalis őssejtek viszont nem fejezik ki a CD133-at (da Silva Meirelles et al., Stem Cells, 2008; 26:2287-299; Nery et al., Cytometry A, 2013; 83:48-61), erről saját laboratóriumunkban is meggyőződünk. Ráadásul az ISCT (= International Society for Cellular Therapy) sem javasolja a CD133 alkalmazását az MSC-k karakterizálása során, ezért nem tartottuk fontosnak ennek a markernek a további vizsgálatát (Dominici M et al, Cytotherapy 2006; 8:315-317).

**2.** Mint a cikkünkben (Urbán et al, Stem Cells 2008; 26:244-253) és a dolgozatban (121. old, és 51. ábra) is leírtuk, a szubletális (250-450 cGy) egésztest besugárzást és kotranszplantációt követően a recipiens állatok csontvelőjében átmeneti kevert kimerizmus alakul ki, vagyis donor és recipiens eredetű vérképző sejtek egyaránt jelen vannak a cukorbeteg egerekben. Ha csökkentjük az alkalmazott sugárdózist (150 cGy), a kevert kimerizmus nem alakul ki és a terápia is hatástalan. Ennek konkrét okát nem ismerjük, de a legvalószínűbb feltételezés az, hogy a donor és recipiens állatok immunsejtjei között olyan alloreakciók jönnek létre, amik gyulladásos citokinek termeléséhez vezetnek. Azt pedig irodalmi adatok és részben saját megfigyeléseink is igazolják, hogy az MSC-k terápiás – regeneratív és immunszuppresszív - hatása csak megfelelő mikro környezetben, gyulladásos citokinek jelenlétében érvényesül. Ezt a folyamatot hívják az irodalomban „*licensing*”-nek (Bernardo and Fibbe, Cell Stem Cell, 2013; 13:392-402; English, Immunology and Cell Biology, 2013; 91:19-26). A fenti feltevést erősíti, hogy amikor gyulladásgátló (indometacin) vagy immunszuppresszív (cyclosporin A) gyógyszert is kaptak kísérleti állataink, az őssejtterápia eredménytelennek bizonyult (saját,

nem publikált eredmények). A pontos mechanizmus(ok) felderítése azonban mindenképpen további kísérleti munkát igényel.

**3.** Terveztünk ilyen kísérleteket, de – tekintettel a szükséges állatok nagy számára – ennek előfeltétele lett volna egy NOD egér tenyészet hazai létrehozása, ami eddig nem sikerült. Ráadásul időközben több munkacsoport igazolta, hogy MSC-k segítségével a NOD egerekben is jelentősen késleltetni lehet a diabetes kialakulását, ha teljes gyógyulás nem is érhető el (Lee et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103:17438-17443; Ezquer et al, Stem Cells. 2012; 30:1664-1674; Kota et al, Diabetes 2013; 62:2048-2058). Utóbbi egyébként a kotraszplantációval sem valószínű, hiszen a NOD egerek immunrendszere a beavatkozás, illetve a beadott őssejtek pusztulása után is folyamatosan újabb és újabb autoreaktív T-sejt klónokat hoz létre, a betegség progressziója tehát nem áll meg, csak lelassul.

**4.** A regulátor T-sejtek arányának alakulását nem vizsgáltuk modellünkben, de az őssejt kezelés hatására minden valószínűség szerint nőtt a számuk és/vagy az aktivitásuk kísérleti állatainkban. Ezt valószínűsíti, hogy az MSC-knek a regulátor T-sejtek expansziójára és működésére gyakorolt pozitív hatását számos preklinikai állatmodellben (Burr et al, Immunol Cell Biol. 2013; 91:12-18) – köztük több diabetes modellben (Madec et al, Diabetologia 2009; 52:1391-1399; Pileggi, Diabetes 2012; 61:1355-1356) is igazolták.

**5.** Ez egy rendkívül intenzíven kutatott terület, hiszen a hasnyálmirigy szigetek transzplantációja az un. „*Edmonton-protokoll*” (Shapiro and Lakey, New England Journal of Medicine, 2000; 343:230-238) keretében elfogadott terápiás beavatkozás cukorbetegeken. A legfőbb probléma az, hogy a beültetett szigetek életképessége és funkciója meglehetősen gyorsan csökken és a betegek néhány év múlva ismét inzulin-pótlásra szorulnak (Langer, Transplant Proc. 2010; 42:1421-1424). Éppen ezért rendkívül nagy jelentőségű lenne, ha sikerülne a Langerhans-szigetek túlélését elősegíteni például az MSC-k által termelt mediátorok segítségével, vagy akár átmenetileg MSC-kkel kokultúrában tartott sziget-graftok alkalmazásával, ahogy professzor asszony javasolta. Kísérleti rendszerekben mindkét módszer bevált (Bell et al, Stem Cells Dev. 2012; 21:1863-1876; Davis et al, Biomaterials 2012; 33:6691-6697; Rackham et al, Cytotherapy 2013; 15:449-459), de klinikai alkalmazásukra – legjobb tudomásom szerint – még nem került sor. Természetesen mi is szívesen dolgoznánk - elsősorban emberi - Langerhans-szigetekkel a jövőben, de ehhez nem

nagyon találunk megfelelő kollaborációs partnert. Klinikusok segítségével pedig nem boldogulunk.

**6.** A myelodysplasiás betegek csontvelői stroma sejtjei kétségtelenül hibásan működnek. Ezt saját eredményeink mellett számos irodalmi adat is alátámasztja (Kitagawa et al, Mol Med Rep. 2011; 4:591-596). Valóban kézenfekvő lenne tehát akár allogén MSC-k segítségével új, egészséges csontvelői stroma állományt kialakítani az ilyen páciensekben. Sajnos ez pillanatnyilag kivihetetlennek látszik, az intravénásan beadott MSC-k ugyanis nem jutnak el a csontvelőbe (Chamberlain et al, Stem Cells 2007; 25:2739-2749; Karp and Teo, Cell Stem Cell 2009, 4:206-216). (Ezért recipiens eredetű például minden csontvelő transzplantált beteg stroma állománya). Ilyen típusú beavatkozásra tehát csak akkor lesz esélyünk, ha sikerül megoldani az MSC-k irányított „*homing*”-ját. Megfelelő adhéziós molekulák, vagy még inkább kemokin receptorok génjeit kifejezésre juttatva az *in vitro* tenyészetben felszaporított MSC-kben talán elérhetjük, hogy a szisztémásan a szervezetbe juttatott sejtek eljussanak a csontvelőbe (is). Ez azonban ma még – néhány szórványos kísérleti próbálkozástól eltekintve (Kumar and Ponnazhagan, The FASEB Journal 2007; 21: 3917–3927; Cheng et al, Molecular Therapy 2008; 16: 571–579) – inkább csak hipotézis, mint reális lehetőség. Így az MDS mesenchymalis őssejtekkel történő kezelése, netán gyógyítása – legalábbis pillanatnyilag – nem reális.

Budapest, 2013.12.16.

Tisztelettel és köszönettel:

Uher Ferenc